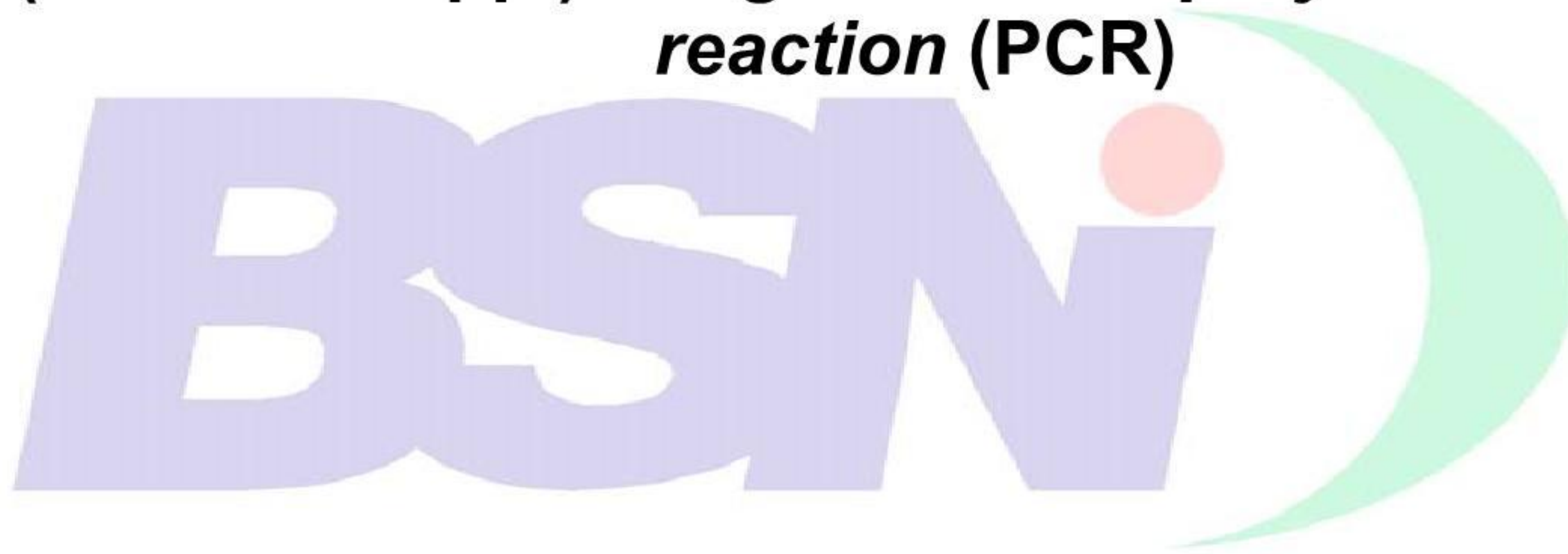


**Metode Deteksi rickettsia-like bacteria pada lobster  
(*Panulirus* spp.) dengan metode *polymerase chain  
reaction* (PCR)**







© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar Isi

Prakata .....	ii
Pendahuluan.....	iii
1. Ruang Lingkup .....	1
2. Acuan Normatif.....	1
3. Istilah dan definisi .....	1
4. Prinsip umum.....	2
5. Peralatan .....	2
6. Bahan .....	3
7. Prosedur.....	3
8. Jaminan mutu .....	6
Tabel 1 - Komposisi koktail PCR .....	5
Tabel 2 – Program amplifikasi jika menggunakan primer 254 F/R = 254 bp .....	5
Gambar 1 – Hasil deteksi <i>rickettsia-like bacteria</i> .....	6
Lampiran A (Normatif)_Hasil alignment sekuen primer dan fragmen standar untuk deteksi <i>rickettsia-like bacteria</i> .....	7
Lampiran B (Informatif)_Prosedur ekstraksi .....	8
Lampiran C (Informatif)_Pembuatan larutan dan media.....	9
Bibliografi .....	10



## Prakata

Standar metode deteksi rickettsia-like bacteria pada lobster (*Panulirus* spp.) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) ini menetapkan metode uji untuk mendeteksi rickettsia-like bacteria, sebagai upaya pencegahan penyebaran penyakit hama dan penyakit ikan/hama penyakit ikan karantina (HPI/HPIK)

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 6 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.





## Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan;
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan;
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan;
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia;
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.





## Metode deteksi rickettsia-like bacteria pada lobster (*Panulirus* spp.) dengan metode polymerase chain reaction (PCR)

### 1. Ruang Lingkup

Standar ini menetapkan prosedur umum untuk melakukan deteksi rickettsia-like bacteria pada lobster (*Panulirus* spp.) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

### 2. Acuan Normatif

SNI 7306, *Pengambilan dan pengiriman contoh air dan ikan untuk pemeriksaan penyakit*.

### 3. Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

#### 3.1

##### **amplifikasi**

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) dengan bantuan enzim polimerase

#### 3.2

##### **annealing**

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

#### 3.3

##### **denaturasi**

pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

#### 3.4

##### **DNA**

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan susunan gula deoksiribosa, gugus fosfat dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

#### 3.5

##### **ekstensi**

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase* sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

#### 3.6

##### **ekstraksi**

proses pemisahan materi genetik dari kultur bakteri atau jaringan contoh uji

#### 3.7

##### **elektroforesis**

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

#### 3.8

##### **koktail**

*mastermix* ditambah DNA *template*



**3.9*****polymerase chain reaction (PCR)***

suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk menyintesis sekuen DNA tertentu dengan menggunakan primer oligonukleotida yang menempel pada sekuen komplementernya

**3.10****pelet**

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

**3.11****primer**

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

**3.12*****rickettsia-like bacteria***

genus dari bakteri yang bersifat non motil, Gram negatif, berbentuk kokus atau batang yang bersifat parasit yang hidup di dalam sel/intraseluler dan menyebabkan penyakit *milky hemolymph disease*

**3.13****supernatan**

cairan hasil sentrifugasi

**3.14****template**

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

**4. Prinsip umum**

Mengisolasi dan memurnikan DNA dari contoh uji yang diduga terinfeksi *rickettsia-like bacteria* untuk dideteksi dengan metode PCR.

**5. Peralatan**

- a) autoklaf;
- b) pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV;
- c) elektroforesis gel agarosa;
- d) alat dokumentasi gel;
- e) freezer -20 °C;
- f) hot plate stirrer;
- g) laminar air flow;
- h) minimixer ;
- i) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- j) peralatan bedah terdiri dari: pinset, gunting, dan pisau bedah;
- k) peralatan gelas;
- l) sentrifus;
- m) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- n) *thermal cycler*;
- o) transiluminator UV;
- p) *waterbath / heating block*



## 6. Bahan

- a) agarosa;
- b) alkohol 70 %;
- c) akuades;
- d) *nuclease-free water/ double distilled water* (DDW);
- e) asam asetat glasial;
- f) *tris acetate* EDTA (TAE) *buffer*;
- g) etanol p.a;
- h) isopropanol (2-propanol);
- i) kit ekstraksi DNA komersial dengan metode *spin column*;
- j) mikrotip berbagai ukuran, 10 µl, - 200 µl, 1 000 µl;
- k) masker;
- l) DNA *marker* (100 bp DNA *ladder*);
- m) *nuclease-free water*;
- n) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- o) pewarna DNA;
- p) reagen PCR;
- q) Primer set 254 F/R = 254 bp (OIE, 2015)  
254F: 5'-CGA-GGA-CCA-GAG-ATG-GAC-CTT-3'  
254R: 5'-GCT-CAT-TGT-CAC-CGC-CAT-TGT-3'
- r) sarung tangan (*powder – free*);
- s) tabung mikro ukuran 0,2 ml, 1,5 ml – 2 ml;
- t) *tris base*.

**CATATAN** Pembuatan larutan dan media diuraikan pada Lampiran A

## 7. Prosedur

### 7.1 Persiapan contoh uji

Contoh uji untuk stadia puerulus diambil seluruh tubuh sedangkan stadia juvenil sampai dewasa diambil *haemolymph*, organ limfoid, hepatopankreas atau jaringan ikat.

### 7.2 Ekstraksi DNA dengan metode *spin column*

- a) panaskan *elution buffer* pada 70 °C sebelum proses dimulai sampai akan digunakan (langkah butir t);
- b) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- c) tambahkan 200 µl *tissue lysis buffer* dan 40 µl *proteinase K* dan homogenkan;
- d) inkubasi pada 55 °C selama 1 jam;
- e) tambahkan 200 µl *binding buffer* dan homogenkan;
- f) inkubasi pada 70 °C selama 10 menit;
- g) tambahkan 100 µl isopropanol dan homogenkan;
- h) buang bagian sampel yang tidak terlarut dengan mikropipet;
- i) pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan;
- j) sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit;
- k) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- l) tambahkan 500 µl *inhibitor removal buffer* ke dalam *filter tube*;
- m) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit;
- n) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;



- o) tambahkan 500 µl *wash buffer* ke dalam *filter tube*;
- p) ulangi langkah butir m) sampai dengan butir n);
- q) sentrifugasi kembali pada 13.000 x *g* selama 10 detik;
- r) buang *collection tube*;
- s) pasangkan *filter tube* dengan *tabung mikro* 1,5 ml steril (*nuclease-free*);
- t) tambahkan 50 µl - 100 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam *filter tube*;
- u) sentrifugasi pada 8000 x *g* selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada tabung mikro merupakan DNA murni;

**CATATAN 1** Prosedur *spin column* di atas merupakan contoh ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial.

**CATATAN 2** Prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan.

### 7.3 Pengukuran DNA

- a) Ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- b) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- c) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ );
- d) simpan larutan DNA pada -20 °C apabila tidak langsung digunakan.

**CATATAN** Prosedur pengukuran DNA disesuaikan dengan alat yang digunakan



## 7.4 Amplifikasi

- siapkan DNA *template* dan bahan *mastermix*;
- buat *mastermix* amplifikasi sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *mastermix* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- homogenkan *mastermix* dan distribusikan 23  $\mu$ l ke masing-masing tabung mikro 0,2 ml;
- tambahkan 2  $\mu$ l DNA *template* contoh uji, kontrol positif, dan kontrol negatif ke dalam *mastermix*;
- lakukan amplifikasi PCR sesuai Tabel 2.

**CATATAN** Komposisi reaksi dan prosedur amplifikasi PCR disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

**Tabel 1 - Komposisi koktail PCR**

Komposisi	Volume ( $\mu$ l )	Konsentrasi akhir
Akuabides	18,125	
10x PCR <i>buffer</i>	2,5	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,75	1,5 mM
dNTP <i>mix</i> 10 mM	0,5	200 $\mu$ M
primer F 10 $\mu$ M	0,5	200 nM
primer R 10 $\mu$ M	0,5	200 nM
<i>Taq</i> DNA polymerase 5U/ $\mu$	0,125	
DNA <i>template</i>	2	10 ng -100 ng
Total	25	
<b>CATATAN</b> Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

**Tabel 2 – Program amplifikasi jika menggunakan primer 254 F/R = 254 bp**

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	95	5 menit	1
Amplifikasi	95	30 detik	30
	65	30 detik	
	72	30 detik	
Ekstensi akhir	65	1 menit	1
	72	2 menit	

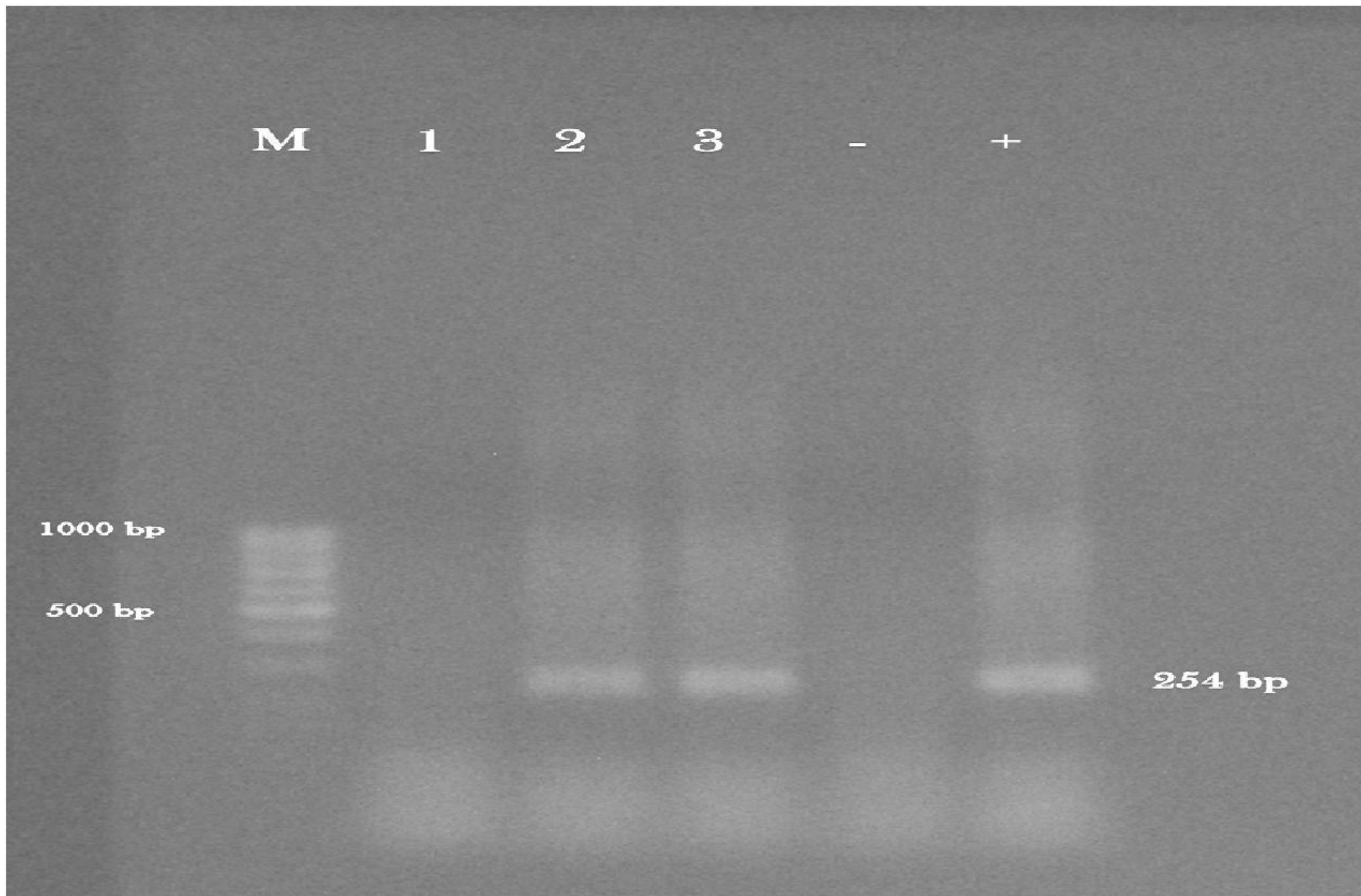
## 7.5 Elektroforesis

- masukkan gel agarosa 1,5 % ke dalam *chamber* elektroforesis dengan posisi sumur (*well*) pada kutub negatif;
- tambahkan larutan 0,5x TBE *buffer* hingga gel agarosa terendam;
- tambahkan 5  $\mu$ l 6x *Loading buffer* ke dalam produk PCR (contoh uji, kontrol positif dan kontrol negatif), campur dengan baik;
- ambil sebanyak 5  $\mu$ l produk PCR dan DNA *Marker*/DNA *Ladder* kemudian masukkan ke dalam lubang sumur gel agarosa;
- lakukan elektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 volt;
- rendam gel agarosa dalam larutan pewarna DNA selama 10 menit;
- selanjutnya gel agarosa direndam dalam akuades selama 10 menit untuk menghentikan pewarnaan;
- gel agarosa diamati di atas transiluminator UV dan dokumentasikan.



### 7.6 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarosa setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan transiluminator UV, maka :



Keterangan :

- M adalah DNA marker 100bp
- 1 adalah contoh uji A ; negatif
- 2 adalah contoh uji B ; positif
- 3 adalah contoh uji C ; positif
- 4 adalah kontrol negatif WSSV
- 5 adalah kontrol positif WSSV

**Gambar 1 – Hasil deteksi rickettsia-like bacteria**

### 8. Jaminan mutu

- a. hasil ekstraksi DNA mempunyai  $A_{260}/A_{280}$  berkisar antara 1,8 – 2,1;
- b. proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.



**Lampiran A (Normatif)**  
**Hasil alignment sekuen primer dan fragmen standar untuk deteksi *rickettsia-like***  
***bacteria***  
*Accession no. AF218266*

(Accession no: [GU947658.1](#))

Kontrol positif :

**CGAGGACCA GAGATGGACC TTTTCAGTTC** GGCTGGATCG GAGACAGGTG

PRIMER 254 F

CTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA  
ACCCTCGCCC TTAGTTGCCA GCATTCAGTT GGGCACTCTA AGGGGACTGC CGGTGATAAG  
CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG GCTACACACG  
TGCT**ACAATG GCGGTGACAA TGAGC**

PRIMER 254 R

**CATATAN:** Standar positif dapat berasal dari sekuen gen DNA *rickettsia-like bacteria* yang kompatibel dengan primer yang digunakan.





## Lampiran B (Informatif) Prosedur ekstraksi

### A.1 Metode presipitasi

- a) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 1 000 µl larutan ekstraksi DNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pestle*;
- c) sentrifugasi pada 10 000 x *g* selama 10 menit;
- d) pindahkan supernatan ke tabung mikro baru yang telah diisi 500 µl etanol 96 %;
- e) kocok tabung mikro secara perlahan, diamkan selama 1 menit;
- f) sentrifugasi pada 4 000 x *g* selama 1 menit;
- g) buang cairan, cuci *pellet* dengan 1 000 µl etanol 75 %, diamkan selama 1 menit;
- h) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
- i) cuci kembali *pellet* dengan 1 000 µl etanol 75 %, diamkan selama 1 menit;
- j) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
- k) tambahkan DDW sebanyak 100 µl - 200 µl dan homogenkan;





## Lampiran C (Informatif) Pembuatan larutan dan media

### C.1 Larutan GelRed 3x *in water* (pewarna DNA)

Cara membuat :

- tambahkan 30  $\mu$ l stok GelRed™ (10 000x) pada 100 ml akuades kemudian aduk sampai homogen;
- tempatkan GelRed 3x *in water* pada wadah yang terbuat dari polypropylene atau plastik;
- simpan pada suhu ruang dan di tempat yang terhindar dari cahaya.

### C.2 Gel agarosa 1,5 %

Cara membuat :

- larutkan 1,5 g agarosa dalam 100 ml larutan 0,5x TBE *buffer* ;
- didihkan hingga larutan menjadi bening;
- tuang gel agarosa setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel agarosa yang telah dipasang sisir;
- tunggu sampai gel agarosa mengeras dan siap digunakan.

### C.3 0,5x TBE *buffer*

Cara membuat:

- buat larutan stok 5x TBE *buffer* sebanyak 500 ml dengan menimbang 54 g *Tris base*, 27,5 g *Boric acid* dan 0,5 M EDTA;
- masukkan semua bahan ke dalam botol kaca tahan panas berkapasitas 1 000 ml;
- tambahkan akuades sampai dengan volume 1 000 ml;
- larutkan bahan dengan menggunakan stirer magnetik sampai tercampur rata;
- sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C;
- untuk membuat larutan siap pakai (larutan kerja) 0,5x TBE *buffer*, larutkan 1 bagian stok dengan 9 bagian akuades.



## Bibliografi

- [1] OIE. 2015. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Milky Haemolimp Disease of Lobster (Panulirus spp.)*

